

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—192364

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>  
A 61 F 1/00  
A 61 B 17/18

識別記号

庁内整理番号  
7916—4C  
7058—4C

⑭ 公開 昭和59年(1984)10月31日

発明の数 3  
審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑮ 軟骨および骨の修復方法

⑯ 特 願 昭59—55198

⑰ 出 願 昭59(1984)3月21日

優先権主張 ⑱ 1983年3月23日 ⑲ イスラエル  
(IL) ⑳ 68218

㉑ 発 明 者 サミュエル・イテイ  
イスラエル国クファル・サバ・  
モシエ・シヤレト・ストリート  
16

㉒ 発 明 者 ズヴィ・ネヴォ

㉓ 出 願 人 イスラエル国ヘルズリア・イエ  
アー・スターン・ストリート11  
ラモット・ユニヴァーシテイ・  
オーソリティー・フオー・アブ  
ライド・リサーチ・エンド・イ  
ンダストリアル・デヴエロプ  
メント・リミテッド  
イスラエル国テル・アヴィヴ・  
ラマット・アヴィヴ・ユニヴァ  
ーシティー・ストリート32  
㉔ 代 理 人 弁理士 安達光雄 外1名

明細書の浄書(内容に変更なし)  
明 細 書

1. 発明の名称 軟骨および骨の修復方法

2. 特許請求の範囲

1. 移植によつて関節の軟骨および骨の欠陥を修復するためのものであつて、その組成物は、その組成物が移植されるべき種の萌芽性軟骨細胞または間葉組織細胞で、線維素原、トロンビン、及び天然ないし化学的プロテアーゼ防止剤の或る量とから成る生物学的膠による軟骨形成誘因子により軟骨細胞に変換されうるものを含んでいるところの、組成物。

2. 毎ミリリットルごとに、100000から500000個の軟骨細胞または間葉組織細胞を含んでいるところの、特許請求の範囲第1項記載の組成物。

3. 5乃至20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の細胞外基質を含んでいるところの、特許請求の範囲第1項記載の組成物。

4. 局所的生長ないしホルモン生長因子剤を含んでいるところの、特許請求の範囲第1項記載

の組成物。

5. 局所的生長因子が軟骨起源生長因子(CDP)または骨起源生長因子(BDGF)であるところの、特許請求の範囲第4項記載の組成物。

6. ホルモン性成長因子が血清または下垂体からのソマトメジンであるところの、特許請求の範囲第4項記載の組成物。

7. 細胞が軟骨細胞または未分化間葉組織捕捉細胞を含む結合組織から導出された細胞、培養中に軟骨細胞になるように増殖し変換されるよう誘導される細胞であるところの、特許請求の範囲第1項記載の組成物。

8. ゲルが、適当な形状にした親水化された(キール骨)または人工的骨中に包埋されているところの、特許請求の範囲第7項記載の組成物。

9. 特許請求の範囲第1項記載の組成物を欠陥組織内に植付けるとを含むところの、骨端軟骨及び骨修復の操作。

10. 細胞外基質(ECM)または適当な局所的ないしホルモン性成長因子で、特許請求の範囲

第1項記載の細胞の少量を含むか、またはそうした細胞を欠いているものと共に、トロンビン、アンチプロテアーゼ及び線維素原とから成る生物学的ゲルで含浸された適当に形状づけられた骨構造を含むところの、軟骨ないし骨修復用の移植。

### 3. 発明の詳細な説明

本発明は移植により関節軟骨の欠陥と骨の欠陥とを修復するために使用するための組成物に関するものである。本発明の組成物はそうした修復用に使用できる。それらは、それとして、または天然または人工骨をキャリアとして一緒にして、ゲルの形で提供される。以下の記述は主として関節軟骨の修復に関連しているが、これは最も問題であり繊細な生物学構造であるからである。本発明の新規な組成物は、軟骨形成誘因因子の影響により潜在的に軟骨細胞に変換されるところの萌芽性の軟骨細胞ないし或る間葉組織細胞を組合せて含んで居り、細胞は適量の線維素原、トロンビン、及びアンチプロテアーゼ

る試みも報告されたが移植物と隣接する軟骨との一体化は一般に不満足であつた。

本発明によれば、直ちに使用可能な組成物が提供され、萌芽性の軟骨細胞または、間葉組織起源の細胞、何等かの種類のもので、軟骨形成誘因ファクターの影響により、試験管内または生体内で軟骨細胞へ変換されうるもので、“ゲル”を形成する適当な生物学的媒体中で大人の関節軟骨及び骨への損傷の修理に対して、損傷の場所への移植により行うのに使用しうるものが提案されている。また、そうした移植可能材料の生産用の操作もまた提案されている。

また、軟骨の欠陥の修理に使用する組成物も提案されている。その組成物は、適当な萌芽性の組織の機械的破壊と共にトリブシン化による萌芽性軟骨細胞（若さを留めた軟骨細胞）の遊離で作り、ついで適当な媒質上で培養し、細胞を収獲し、それらを線維素原、アンチプロテアーゼ及びトロンビンを加えてその結果として、培養器中で限られた時間の期間貯蔵ができるゲ

を組合せて膠として役立つように作られている。結果としてできるゲルは組織培養貯蔵条件下に長期間に渉つて貯蔵でき、輸送でき、容易に取扱うことができる。

本発明の好ましい態様によれば、細胞外基質（ECM）、または、SM、PGF、CGF、BDGFの如き或る生長ファクターまたはこれらの何れかの組合せをそうしたゲル中に内蔵させられうる。骨の或る欠陥の修復のためには、そうしたゲルで満して適当な形状にした骨部材を含む移植物を使用しうる。

本発明の他の更に別の特徴は今後明かとなるであろう。

関節軟骨が外傷、感染ないし退化性操作によつて損ぜられると、そうした損傷は一般に治し得ず、改良さえもできない。これまで、骨軟骨移植にたよることや、種々の形の補綴を用意することに種々の試みが行われて来たが、長期的結果は貧弱であり落胆すべきものであつた。軟骨移植の源泉として培養した軟骨細胞を使用す

るを得、または、収獲された細胞が望むゲルへ使用する前に深冷及び水解によつて長期間保存されうるようになるようなゲルを得る。ゲルは、欠陥を満すようにトロンビン溶液を噴霧した移植の場所に適用する前に線維素原の溶液中に浸されている。動物実験（鳥類及び哺乳類種につき）に於て、軟骨と骨との欠陥は2乃至12ヶ月の期間後の検査したところでは、初期損傷の侵れた修復を示して居て、正しく満されたことが示された。

本発明の組成物は、外傷ないし老齢のせいで人間関節軟骨または骨の損傷の修復に価値がある。そうした損傷は種々の型の軟骨及び骨で、接合部の退化性傷害や破砕を含んでいる。

本発明の好ましい態様によれば、本発明の新規な処方は、以下に於て開示される如くに特殊技法で調製される萌芽性軟骨細胞の成層の細胞外基質（ECM）を含んでいる。

ECMを脱けることで、新規な組成物が植付けられた時に軟骨細胞の成長を高めるが、これら

が望む天然環境に似ている事が最も確からしい。

軟骨細胞は、移植される材料が適用さるべき種の適当な萌芽性骨端組織から得られる。異質形成細胞は、HLA タイプ化にたよる必要なしに全く満足な結果を与える。人間での使用に対しては、人間萌芽性軟骨細胞が培養された。

毎単位容積当りの軟骨細胞数は或る値を超えないものであるべきである。それでない、細胞の崩壊死が生じ、より劣る結果が得られる。軟骨細胞濃度の代表的値は、ゲルの毎ミリリットル当り約100000から500000である。毎ミリリットル当り約5から50単位のトロンビンと約25から80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  線維素原が使用される。一般にプロテアーゼ抑制剤を、ゲルの速い溶解を防ぐか、抑えるため組成物へ加える。天然または合成プロテアーゼ抑制剤を使つてもよい。適切なプロテアーゼ抑制剤は、ゲルの約10から20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の量で使用される  $\epsilon$ -アミノカプロイン酸、ゲルの約1から2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の量で使用されるトランエキゼミン酸の如きで

たは、欠陥個所に直接に適用しうる。

或る修復に対しては、トロンビン、アンチプロテアーゼ、線維素原及び一つ以上の成長ファクターおよび/または上に規定された型の細胞の小濃度を伴うか、または、そうした細胞なしでさえも、ホルモンから成るゲルで満たした骨構造(天然または人工)から成る移植を利用することが推奨される。後者の場合、環境からの細胞が移植内に徐々に滲透し、環境と移植との間に凝集性一体物を形成する。

本発明を下記の例を参照して描写するが、これは非制限的な具合に解釈すべきものである。

#### 例1: 軟骨修復用組成物の調製

出発材料として長い骨(腰骨、大腿骨)の骨端を使用した。

萌芽性軟骨細胞(若さを留めた軟骨細胞)の遊離操作は、骨端の激しいトリプシン化から成っている(1%のトリプシンを45分間、37℃の水浴中で回転振盪機にかけて培養し、同時に、手動チャンネル付テフロンホモジェナイザ

ある。アンチ・トリプシン(チキン卵白、シグマ、第III型)の如き天然プロテアーゼ抑制剤を使つてもよい。ゲルの速い形成が望まれる時は、5から10単位毎 $\text{ml}$ の程度の量のトロンビンが使用され、ゲルの速い硬化が望まれる時は20から50単位毎 $\text{ml}$ の程度の量のトロンビンが使用される。

上に加えて、ゲル中に、局部型(例えばECM, BMP)またはホルモン性、例えば、ソマトメジン(SH)状ペプチド; 軟骨成長ファクター(CGF); などの一つ以上の成長ファクターを内蔵させると有利である。成長ファクターは、下記の大きさの程度にて使用される: ECM: 若干  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; BDGF: 100マイクログラム/ $\text{ml}$ 程度に; CGF: 2、3ナノグラム/ $\text{ml}$ ; SH: 2、3ナノグラム/ $\text{ml}$ 。

F-12プラス10%子牛胎児血清で作った組成物は、約37℃で $\text{CO}_2$ 培養器内に二、三週の間貯蔵できる。本発明によるゲルは、直ちに使用でき、下記に示す如くに、損傷された、ま

により一定の機械的破壊をする。)トリプシン活性は、反蛋白質分解性物質を含む血清により停止する。出来上った単一細胞懸濁液は、軟骨寒天(Ham-F-12含有0.6%寒天)を塗布した板上の液体Ham-F-12内で数日(6-10日)種除きさせる。この生長期間の間、線維芽細胞の大抵のものは死に去り、軟骨細胞増殖が起る。軟骨寒天板からの細胞は更にスピナー環境内のF-12の懸濁培養内に移され、更に3-10日の期間生長させられる。スピナー環境内の成長条件は再び線維芽細胞よりも軟骨細胞を好んで支持する。スピナー槽からの細胞は遠心分離により採取され、直接に使用されるか、または、液体窒素中にて長期間冷凍保存される(20%胎児子牛血清、10%ジメチルスルフォキシド(DMSO)及び70%F-12)。出来上った軟骨細胞のペレットは、線維素原(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )または如何なる他の血清凝結蛋白及びトリプシン抑制剤(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  シグマ型III)または他のアンチプロテアーゼを含む小容積の

磷酸緩衝塩水中に再懸濁される。

細胞（培養の期間と大きさに従って濃度が  $1-5 \times 10^5$  細胞/ml の間に涉っている）と、線維素原とトリブシン抑制剤とを含んでいる最後の溶液を溶液 A とする。マイクロテスト板（蓋付き 96 F Nunc デンマーク）または、多岐井戸に、トロンビン溶液（溶液 B）（ $40 \text{ mM CaCl}_2$  の  $1 \text{ U} / 30 \text{ ml}$ ）の  $30$  マイクロリットルを各井戸へ加え（底及び側壁上に平均に分布して）、それから溶液 A を  $90$  マイクロリットル加え、そして混合物を固化（ゲル化）させる。

需要に従って、最後の量は変化出来、かくて、溶液 A と B の比を  $3:1$ （ $v/v$ ）に保つ。F-12 の  $0.2 \text{ ml}$  で固めたゲルはそれから成期間（約  $14$  日）、 $5-10\%$   $\text{CO}_2$  を空気に入れて平衡化した培養器中か、または冷凍保存されて、保たれることができる。

移植では、損傷した場所をトロンビン溶液で繊細に噴霧し、他方、移植に先立つゲルは線維素原とトリブシン抑制剤を含む（それぞれ  $50$

塗布した皿上にアスコルビン酸（ $5.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）で補足した F-12 媒質中に維持した。培養からは  $6$  日以内に合流になり、それから媒質を更新し、また培養を更に追加の  $6$  日間培養した。三皿の培養の組はトリブシン化され、Coulter 計数器（モデル工榮 D）により細胞計数を調べる為に使用した。末端での細胞計数は  $1 \times 10^6$  細胞/板の周りの範囲であつた。総ての他の板をそれから磷酸緩衝塩水（PBS）で洗浄し、 $20$  分間蒸留水中で  $20 \text{ mM NH}_4\text{OH}$  に浸した。そして  $3$  回 PBS で再洗浄し、蒸留水で  $2$  回最終洗浄し、細胞体質ないし核が、皿に塗布したもとのままの ECM と組合されて認められることがないようにした。ECM はゴムポリスチレンで採集して凍結真空乾燥した。乾燥粉末化 ECM の収率は  $0.3-1.0 \text{ mg}/\text{板}$  の間の範囲であつた。

ECM は  $5$  乃至  $20 \text{ mg}$  毎リットルの量で混ぜ合わせた。最良の結果は約  $10 \text{ mg}/\text{ml}$  で得られた。軟骨細胞ゲルを種々の種（鳥類及び哺乳類）内の移植として実験し、巨視的観察、組織学的

$\text{mg}/\text{ml}$  及び  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）溶液中に浸漬し、そして試料を損傷した場所に圧入し欠陥を滑らかに満す。

萌芽性軟骨細胞の代りに、萌芽性間葉細胞（段階 24）または骨髓幹細胞を使つてもよい。加うるに、トラップされた非差分化間葉細胞をつけた加何なる成人連結組織を使用してもよく、培養中に細胞を発生し、それが最後に自己差分化により軟骨細胞に変形され、または軟骨細胞ファクターにより指向される。

先天性移植に対しては、受容体の成人組織内にトラップされた同質性間葉細胞型細胞で、皮膚線維芽細胞、生後により得られる骨髓細胞の如きを使つてもよく、これらは、培養中に細胞を生じ、それらが軟骨細胞に変換される。

## 例 2：ゲル含有 ECM（細胞外基質）

### a. ECM の調製

スピナー板（ $14-21$  日培養中）からの萌芽性ひよこ軟骨細胞を、 $2 \times 10^5$  細胞/ $35 \text{ cm}^2$  皿の初期濃度で板にし、フィブロネクチンを

断面及び生化学試験により採集したデータは、移植の場所に於て、二三ヶ月以内に、欠陥は活性の増殖する軟骨細胞で正しく満され（関節軟骨の表面を含めて、環境に調整されて）、特徴的な（表現型の）代謝性体質と古い隣接軟骨組織と積置つた井戸（線維軟骨、または他の軟かい組織がへりに無い）とを表していた。

特許出願人

ラモット・ユニヴァーシティ  
・オーソリティ・フォー・  
アブライド・リサーチ・エン  
ド・イングストリアル・ダイ  
ヴェロプメント・リミテッド

代理人

安達光雄

同

安達

特許  
代理人  
安達  
光雄

特許  
代理人  
安達  
光雄

## 手 続 補 正 書

昭和59年4月26日

特許庁長 官 若 杉 和 夫 殿

1. 事件の表示 昭和59年特許願ヤ55198ヤ

2. 発明の名称

軟骨および骨の修復方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

~~特 許 出 願 人~~

4 字削除

~~フ リ ガ ナ~~ 名 称

ラモット・ユニヴァーシティ・オ・ソリテイ・

フォー・アフライト・リサーチ・エント・インダスト 2字削除

リアル・デバロフメント・リミテッド

4. 代 理 人

任 所 大阪市西区江戸堀1丁目22番32号  
(電話06441-1816・444-4530)

氏 名 (5969) 安 達 光 雄

5. 補正の対象 明細書

6. 補正の内容 明細書、序言(内容に変更なし)

7. 添付書類目録

明細書(序言(1-2)) 1 通

BEST AVAILABLE COPY